

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K14859

研究課題名（和文）下水由来毒性物質群の特性解析と即時モニタリング指標の開発

研究課題名（英文）Characterization of wastewater effluent derived toxic matters and development of real-time monitoring indicator

研究代表者

原 宏江 (Hara-Yamamura, Hiroe)

金沢大学・地球社会基盤学系・助教

研究者番号：70823524

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：水の循環利用における未規制化学物質の制御・監視は世界共通の課題である。本研究では、下水再利用システムにおいて優先的に制御・監視すべき微量化学物質に関する情報を得ることを目的として、下水由来フミン物質と微量化学物質の相互作用の解明、下水由来毒性物質群の監視指標の開発に取り組んだ。遺伝子発現解析と吸着量評価の併用により、下水由来フミン物質のうち塩基性の画分が、ステロイドホルモン物質と反応し毒性影響を低減あるいは増加させる能力を有することが明らかとなった。また、蛍光分析データの多変量解析により、2万Da以下のサイズを有する蛍光物質が下水由来毒性物質群の指標となりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

下水処理水は、処理過程で生じる副生成物・代謝物、微生物由来の溶解性有機物、水道水由来の自然有機物等が織り成す複雑な処理水マトリクスを構成している。本研究の知見は、下水再利用システムにおいて制御・監視すべき微量汚染物質を絞り込むために有用である。また、対象物質が明らかになれば、これらに対し有効な高度処理技術の開発にも着手できる。一方で、処理水マトリクスには多くの自然由来有機物が含まれていることから、吸着特性データは、自然の水環境中での微量汚染物質の挙動や毒性影響を研究する上でも役立つ。

研究成果の概要（英文）：Control and monitoring of unregulated chemicals in water reuse systems are common challenge in the world. In this study, we aimed to get insights into the prioritized chemicals for control and monitoring in the wastewater reclamation schemes, by 1) investigation of interaction between wastewater effluent organic matters (EfOM) and micropollutants, and 2) development of monitoring indicator for the toxic fraction of EfOM. The combination of transcriptomic analysis and adsorption assessment revealed that the basic fraction of EfOM was capable of mitigate or enhance the biological activity of steroid hormones. In addition, the multivariate analysis of fluorescence spectra data suggested the fluorescence matters with 20,000 Da or smaller size had a potential indicator for the toxic unknowns in the wastewater effluent.

研究分野：環境工学

キーワード：下水由来フミン物質 未規制化学物質 細胞毒性試験 トキシコゲノミクス 蛍光分析 下水再利用

1. 研究開始当初の背景

都市下水は、身近に存在し、天候に左右されない水資源として世界各地で活用が進められているが、下水中の農薬や医薬品等の微量汚染物質の中には、高度処理によっても除去困難なものがあるほか、処理過程で多様な副産物が生じ、これら下水由来の未規制化学物質による人体及び生態系への影響は下水再利用システムにおける潜在的な懸案事項となっている[1]。

一般に、水の安全性評価は、毒性の懸念される化学物質について機器分析を行い、水中濃度と飲用に供した際の許容摂取濃度の比較により行われる。しかし、化学分析では、未知の物質や複合毒性については検討できず、包括的な毒性評価とはいえない。一方、個別物質によらず水全体の毒性影響を捉える手法として生物試験(バイオアッセイ)があるが、既存の人への毒性影響を評価する試験法は、変異原性やエストロゲン活性等の毒性作用に限定されている。原は、最も初期の生体応答である遺伝子発現を網羅的に解析することにより、高度下水処理水中の微量な残留成分がヒト培養細胞に与える影響を高感度に検知し、複数の毒性作用について同時に検討可能な手法を開発した[2]。本手法により、下水処理水の有する毒性作用にフミン物質様の有機物が関与することが明らかになってきた[3]。フミン物質とは、水試料中の XAD 樹脂に吸着し希アルカリ水溶液で溶出される画分として定義され、さらに酸に可溶性フルボ酸と、不溶性フミン酸に分類される。採取場所によってそれぞれ異なった特徴を有するが、陸・河川・海等の自然由来フミン物質の特性がよく知られる一方、下水由来フミン物質の特性を対象とした研究は少なく、特に毒性に関する知見は皆無である。

下水再利用システムにおいて毒性物質の残留を阻止するためには、下水由来フミン物質の物理化学的特性を詳細に把握するとともに、その残留を簡便かつ迅速に検知可能な管理指標の開発が不可欠である。また、毒性の作用機構(下水由来フミン物質自体が毒性を有するのか?あるいは、何らかの微量汚染物質の毒性プロモーターであるのか?)を解明することは、限られた人的・経済的資源の下で制御・監視対象となる微量化学物質の優先づけのために不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、下水再利用システムにおいて制御・監視対象となる微量化学物質の優先づけを行うために必要な知見を得ることを目的として、(1)下水由来フミン物質の特性解析とヒト細胞への作用機構の解明、(2)下水由来毒性物質の即時モニタリング指標の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) 下水由来フミン物質の特性解析とヒト細胞への作用機構の解明

対象化学物質

水環境中での検出状況及び生体影響を考慮し、3種のステロイドホルモン、エストロン(E1)、17-エストラジオール(E2)及び17-エチニルエストラジオール(EE2)を対象として、下水由来有機物との相互作用を検討した。

分画

実下水処理場から採取した放流水を0.22µmフィルターによりろ過し、イオン交換樹脂を用いた分画に供した。Fangら(2017)の手順に従い、Waters社のOASIS MCX及びMAXカラムを用いて、酸性疎水性画分(HOA)、塩基性疎水性画分(HOB)、中性の疎水性画分(HON)にそれぞれ分画した。

化学分析

HOA、HOB、HONの各画分1mLを採取し、窒素流下、40度で乾固させた後、超純水に再溶解し、TOCを測定した。また、同様に乾固させた各画分を超純水で2mg/Lに調整し、三次元蛍光分析装置(日本分光FP-8000)を用い蛍光スペクトルデータを取得した。

細胞毒性試験

3種のステロイドホルモン、EfOM画分の単独暴露及びEfOMとステロイドホルモンとの混合暴露において、ヒト肝癌由来細胞株(HepG2)の48時間後の細胞生存率をMTTアッセイにより測定した。ステロイドホルモンの単独暴露は、0.1ng/Lから10mg/Lの幅広い濃度範囲で実施した。混合暴露では、暴露1時間前にステロイドホルモン1mg/Lに対してEfOM画分が0.5mg/L(いずれも終濃度)となるよう混合し、使用した。

遺伝子発現解析

細胞の生死よりも早期の毒性影響を鋭敏に検知するために、細胞毒性試験と並行してマーカー遺伝子を用いた遺伝子発現解析を行なった。マーカー遺伝子は、Fukushimaら(2017)の報

告に基づき, 7 つの細胞毒性応答遺伝子 (*NNMT*, *VNN1*, *FABP1*, *LGALS3*, *AQP3*, *AKR1B10*, *SERPINE1*), 5 つの遺伝毒性応答遺伝子 (*CDKN1A*, *GADD45*, *MDM2*, *BCL2*, *TP5313*), 9 つの生体異物応答遺伝子 (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2A6*, *CYP2B6*, *CYP2C8*, *CYP2D6*, *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP3A5*), 計 21 のマーカー遺伝子を対象とした。ハウスキーピング遺伝子には *GADPH* を用いた。ステロイドホルモンの単独暴露 (1 mg/L) 及び EfOM 画分との混合暴露の両方において, 48 時間暴露後の HepG2 から mRNA を抽出し, 逆転写後, Quant Studio 5 (Applied Biosystems) により発現量を測定した。発現量はコントロール (溶媒暴露群) に対する相対値として Ct 法を用いて算出した。

水晶振動子マイクロバランス (QCM)

水晶振動子マイクロバランス (QCM) は, 水晶振動子センサーの周波数変化から, センサー上に堆積する物質を精密に定量することが出来る手法であり, 微量天秤として様々な分野で利用されている。本研究では, 表面にステロイドホルモンを固定した QCM センサーを作製し, Affinix QN pro (ULVAC) を用いて EfOM 分画試料 (1 mg-炭素/L に調整) のステロイドホルモンへの吸着量を測定した。

(2) 下水由来毒性物質の即時モニタリング指標の開発

サンプリング

全国各地より水道水 159 検体, 湧水 15 検体, 市販のボトルウォーター 29 検体 (計 203 検体) の飲用水サンプルを収集した。また, 高度下水処理水サンプルとして, MBR 処理水 2 検体と, RO 処理水 3 検体 (新膜及び劣化膜 2 種: 脱塩率 20%, 40%) を取得した。

水質分析

三次元蛍光分析装置 (日本分光 FP-8000) を用い蛍光スペクトルデータを取得した。また, TOC, TN, UV 吸光度を測定した。

主成分分析

フリー統計ソフト R の Chemometrics パッケージを用いて, 蛍光スペクトルデータの主成分分析を行った。

Variational Autoencoder (VAE)

Variational Autoencoder (VAE) は, 入力データを低次元化し, また元の次元に復元する機械学習モデルであり, 入力データと復元データの差異 (= 再構成誤差) が最小になるように学習を行う。よって, 学習済みモデルに新規データを入力した際, 再構成誤差が小さいほど新規データと学習データの類似性が高いと言える。飲用水データ 160 件を用いて学習をし, 残りの飲用水データ 43 件及び高度処理水データ 3 件について評価を行った。VAE の実装には Python のライブラリ Pytorch を用いた。

4. 研究成果

(1) 下水由来フミン物質の特性解析とヒト細胞への作用機構の解明

E2 及び EE2 の単独暴露 (1 mg/L) 及び EfOM 画分との混合暴露 (ステロイドホルモン: EfOM 画分 1 mg/L: 0.5 mg/L) における, マーカー遺伝子の発現変動を図 1 に示す。E2 の単独暴露では, マーカー遺伝子の大部分が下方変動していた。同様の傾向は乳がん細胞 (MCF7) に E2 を暴露した実験でも確認されている [8]。最も顕著に上方変動・下方変動していた遺伝子はそれぞれ, *NNMT* (i.e., \log_2 FC=6.54) と *CYP2D6* (i.e., \log_2 FC=-3.04) であった。遺伝毒性応答遺伝子の発現変動 (i.e., \log_2 FC: -1.30 ~ -0.57) は, 細胞毒性応答遺伝子 (i.e., \log_2 FC: -2.08 ~ 6.54) や生体異物応答遺伝子 (i.e., -3.04 ~ -0.08) に比べ小さかった。対照的に, EE2 の単独暴露では, 全てのマーカー遺伝子について上方変動が確認された。特に, *CYP1A2* (i.e., \log_2 FC = 3.30) 及び *AQP3* (\log_2 FC= 3.25) の変動が大きかったが, E2 と同様に, *NNMT* が顕著に上方変動していた (\log_2 FC= 2.40)。また, 遺伝毒性応答遺伝子の発現変動は比較的小さな値となった (i.e., \log_2 FC: 0.67 ~ 1.04)。

E2 の単独暴露と EfOM 画分との混合暴露を比較すると, HOA 及び HON との混合時には遺伝子発現変動に明確な変化はなく, 多くのマーカー遺伝子が下方変動を示したのに対し, HOB との混合時には *AQP3* を除く全ての細胞毒性応答遺伝子・遺伝毒性応答遺伝子が上方変動に転じていた。一方, EE2 と HOB の混合曝露には, 特に, 遺伝毒性応答遺伝子・生体異物応答遺伝子において発現変動が減少する傾向があった。

E1, E2 及び EE2 を固定した QCM センサーへの各 EfOM 画分の吸着厚さを表 1 に示す。E1 固定センサーへの HOA, HOB, HON の吸着厚さはそれぞれ, -0.55 nm, 1.09 nm, 1.50 nm となり, HON への吸着量が最も多かった。負値はセンサーに固定された物質の脱着を示唆している。対して, E2 及び EE2 の場合には, 吸着厚さはいずれの物質でも HOA < HON < HOB の順に大きく, HOB においてそれぞれ 3.913 nm, 1.584 nm と最も高い値となった。また, 全ての対象物質において HOA の吸着量が最も小さかった。蛍光分析において, HOB 成分のチロシンやトリプトファンへの類似性が

示唆されたことから、これらアミノ酸に共通する官能基や構造が HOB の示した E2・EE2 への高い吸着特性に寄与するのではないかと推察する。

最も吸着量の大きな HOB との混合曝露時に E2・EE2 双方において遺伝子発現パターンの顕著な変化が観察されたことから、これらステロイドホルモンが HOB と複合体を形成し、単独曝露時と比べ、細胞への取り込み、あるいは、細胞との反応性に変化が生じたものと考えられる。前者を仮定すれば、同じ EfOM 画分が E2 に対しては取り込みを促進する方向に、EE2 では抑制する方向に作用したことになる。後者を仮定すれば、E2 では HOB と複合体を形成することで反応性が高まった一方、EE2 では反応性が弱まったと考えられる。以上の結果から、下水由来の疎水性有機物のうち塩基性の画分は、ステロイドホルモンに作用し、その細胞影響を変化させることが示唆された。特に、E2 の有する細胞毒性作用を増長する可能性が示された。



図1 E2及びEE2の単独曝露・EfOM画分との混合曝露における21の毒性マーカー遺伝子の発現変動 (log₂ FC)

表1 ステロイドホルモン固定センサーへのEfOM画分の吸着厚さ (nm)

	E1	E2	EE2
HOA	-0.55	0.60	0.19
HOB	1.09	3.91	1.58
HON	1.50	1.18	1.24

(2) 下水由来毒性物質の即時モニタリング指標の開発

飲用水サンプルの蛍光スペクトルデータを用いて主成分分析を行った結果を図1に示す。第一主成分によりミネラルウォーターと水道水・湧水が、第二主成分により水道水とミネラルウォーター・湧水が大別された。同じ飲用水でも多様な蛍光特性を有することが明らかとなった。飲用水のスペクトルデータを用いてVAEモデルを構築した。学習が良好に収束し、過学習も見られなかった。

学習済みモデルに 43 件の飲用水データ及び高度下水処理水データを当てはめた場合の再構成誤差を図 2 に示す。飲用水の平均値が 0.307 であったのに対し、MBR 処理水は 10.95 及び 6.738 であり、10 倍希釈試料でも顕著に高かった。一方、RO 処理水（新膜）の再構成誤差は 0.261 と飲用水平均より小さく、劣化 RO 膜（脱塩率 40%）でさえ、0.310 と飲用水と同等の値となった。以上の結果より、一部の高度下水処理水は、蛍光特性において飲用水と同等であることが示唆された。

機械学習モデルを用いて飲用水と高度下水処理水の水質の類似性を検討した結果、蛍光特性の観点では、RO 処理水（新膜及び脱塩率 40%の劣化膜使用時）が飲用水と同等であることが示唆された。

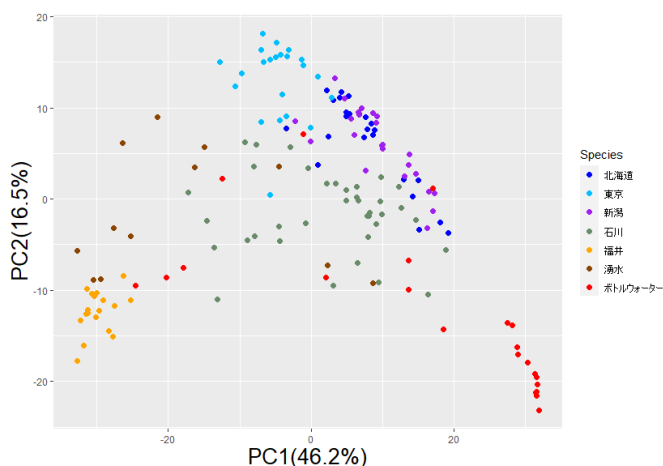


図 2 飲用水 EEM データによる主成分分析

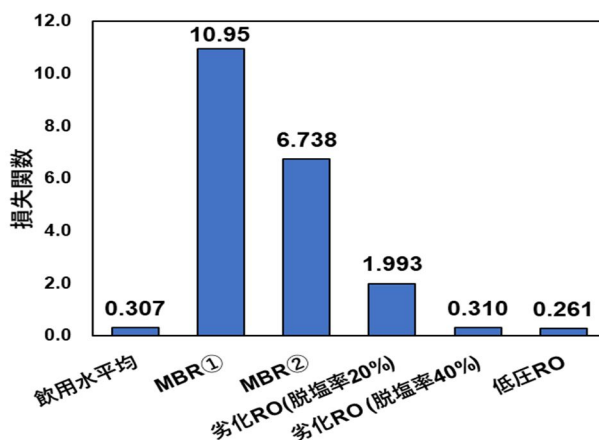


図 3 飲用水モデルの損失関数による飲用性の評価

参考文献：[1] Angelakis et al., *Frontiers Environ. Sci.* 6, 2018; [2] Escher et al., *Environ. Sci. Technol.* 45, 2011; [3] Zhang et al., *Environ. Sci. Technol.* 52, 2018; [4] Hara-Yamamura et al., *Chemosphere* 240, 2020; [5] Hara-Yamamura et al., *Chemosphere* 286, 2022; [6] Fang et al., *Talanta* 162, 2017; [7] Fukushima et al., *Chemosphere* 188, 2017; [8] Neale et al., *Environ. Sci. Technol.* 46, 2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 原宏江、Y.B.P.カハタガハワッタ、倉静雅、山口裕通、本多了、松浦哲久、池本良子、山村寛
2. 発表標題 最新統計手法と伝統的分画手法の組み合わせによる下水由来毒性物質群の探索
3. 学会等名 第55回日本水環境学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷恭平、原宏江、池本良子、山村寛、本多了
2. 発表標題 機械学習を用いた3次元蛍光スペクトルデータに基づく『飲用水』の判別
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Bhagya Kahatagahawatte, Hiroe Hara-Yamamura, Hiroshi Yamamura, Ryo Honda
2. 発表標題 Mixture effects of steroid hormones and dissolved effluent organic matters derived from wastewater on HepG2 cells
3. 学会等名 14th International Conference Challenges in Environmental Science & Engineering (CESE 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------